

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
22. November 2001 (22.11.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/87300 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: A61K 31/415, C07D 233/88 (74) Anwälte: SCHWARZ, Albin usw.; Wipplingerstrasse 32/22, A-1010 Wien (AT).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/AT01/00138 (81) Bestimmungsstaaten (national): JP, US.

(22) Internationales Anmeldedatum: 14. Mai 2001 (14.05.2001) (84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

Veröffentlicht:

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

— mit internationalem Recherchenbericht

(30) Angaben zur Priorität:
A 853/2000 16. Mai 2000 (16.05.2000) AT

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): F. HOFFMANN-LA ROCHE AG [CH/CH]; Gren-
zacherstrasse 124, CH-4070 Basel (CH).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SCHAFFAR, Bern-
hard, Peter, Harald [AT/AT]; Nepomukgasse 27, A-8045
Graz (AT).

(54) Title: CREATININE BIOSENSOR

(54) Bezeichnung: CREATININ-BIOSENSOR

(57) Abstract: The invention relates to a method for producing biosensors that comprise at least two enzymes for the amperometric determination of enzymatically cleavable substances, such as creatinine, in biological liquids, the enzymes being immobilized on a working electrode. An enzyme is applied on the working electrode with one or more surface-active substances in an aqueous solution and is allowed to dry. The at least second enzyme is chemically immobilized thereon in a subsequent step, thereby allowing for shorter response times and stronger signals of the biosensor.

(57) Zusammenfassung: Bei einem Verfahren zur Herstellung von Biosensoren mit mindestens zwei Enzymen zur amperometrischen Bestimmung enzymatisch abbaubarer Stoffe, wie Creatinin, in biologischen Flüssigkeiten, wobei die Enzyme an einer Arbeitselektrode immobilisiert werden, wird ein Enzym mit einem oder mehreren oberflächenaktiven Stoffen in wässriger Lösung auf die Arbeitselektrode aufgebracht und trocknen gelassen und wird das zumindest zweite Enzym in einem nachfolgenden Schritt darauf chemisch immobilisiert, woraus kürzere Ansprechzeiten und größere Signalhöhen für den Biosensor resultieren.

WO 01/87300 A1

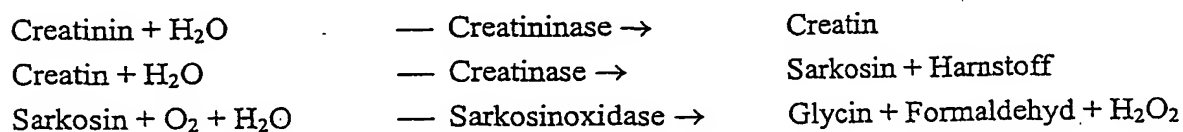
CREATININ-BIOSENSOR

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Biosensoren mit mindestens zwei Enzymen zur amperometrischen Bestimmung enzymatisch abbaubarer Stoffe in biologischen Flüssigkeiten, wobei die Enzyme an einer Arbeitselektrode immobilisiert werden. Die Erfindung betrifft weiters einen Biosensor, insbesondere zur Bestimmung von Creatinin.

Die Bestimmung enzymatisch abbaubarer Stoffe, wie Creatinin, Glucose, etc., mittels Sensoren in biologischen Flüssigkeiten, zum Beispiel in Blut, Urin, Plasma, Serum und Liquor, erfolgt vorzugsweise über Biosensoren mit immobilisierten Enzymen. In der Literatur sind mehrere elektrochemische und photometrische Verfahren zur Bestimmung dieser Stoffe bekannt.

So kann beispielsweise über das Enzym Creatinine Deiminase mit nachfolgender Bestimmung des Ammoniumgehalts Creatinin potentiometrisch bestimmt werden. Ein anderes Verfahren besteht darin, die Creatininkonzentration über eine Enzymkaskade unter Verwendung der Enzyme Creatininase, Creatinase und Sarkosinoxidase zu bestimmen, wobei letztendlich Wasserstoffperoxid (H_2O_2) an einer amperometrischen Elektrode gemessen wird.

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Herstellung von Biosensoren, die nach dem letztgenannten Prinzip arbeiten. Hierzu müssen die Enzyme coimmobilisiert werden, um die Umsetzung von Creatinin in das amperometrisch detektierbare Molekül Wasserstoffperoxid zu ermöglichen. Die Umsetzung von Creatinin zu Wasserstoffperoxid erfolgt nach den folgenden Reaktionsschritten:



An der amperometrischen Elektrode wird Wasserstoffperoxid anodisch bei -350 mV gegen Ag/AgCl oxidiert. Der dabei fließende Strom ist der Creatininkonzentration proportional.



Der bei der Elektrodenreaktion rückgewonnene Sauerstoff wird zur Oxidation des Sarkosins weiterverwendet.

Im Stand der Technik sind mehrere Arten zur Immobilisierung der drei verwendeten Enzyme bekannt. Gemäß T. Tsuchida, K. Yoda, Clin. Chem. 29/1, S. 51, 1983, werden alle drei Enzyme mit Glutardialdehyd vernetzt.

Diese Methode der Immobilisierung besitzt jedoch den Nachteil, daß mit einem derartig hergestellten Biosensor nur eine geringe Signalthöhe erreicht wird, d.h. nur eine geringe Stromänderung feststellbar ist, da die derart immobilisierte Sarkosinoxidase fast ihre gesamte Aktivität verliert. Eine möglichst große Signalthöhe ist jedoch speziell bei der Creatininbestimmung besonders wichtig, weil die Creatinkonzentration vor allem in Blut äußerst niedrig ist (ca. 50 μM) und zudem die Creatinase nur in sehr geringen spezifischen Aktivitäten (max. 20 iu/mg) erhältlich ist. Weiters weist ein derart immobilisierter Sensor hohe Ansprechzeiten auf.

In der US-A - 5,466,575 ist ein Verfahren beschrieben, bei dem Sarkosinoxidase und Creatininase in einem photovernetzbaaren Fisch-Gel immobilisiert und anschließend mit Creatinase in einem filmbildenden Polyvinylacetat-co-vinylalkohol-Latex überschichtet werden.

Nachteilig hierbei ist jedoch die aufwendige Photovernetzung, die eine einfache Herstellung des Biosensors unmöglich macht.

Die Erfindung stellt sich die Aufgabe, ein Verfahren der eingangs genannten Art bereitzustellen, das die oben genannten Nachteile und Schwierigkeiten überwindet. Insbesondere soll das erfindungsgemäße Verfahren eine einfache Herstellung eines Biosensors ermöglichen, mit welchem sowohl kurze Ansprechzeiten als auch große Signalthöhen erzielbar sind. Insbesondere soll die Immobilisierung der Enzyme bei Raumtemperatur möglich sein.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß ein Enzym mit einem oder mehreren oberflächenaktiven Stoffen in wäßriger Lösung auf die Arbeitselektrode aufgebracht und trocknen gelassen wird und das zumindest zweite Enzym in einem nachfolgenden Schritt darauf chemisch immobilisiert wird.

Für die Zwecke der vorliegenden Beschreibung und Patentansprüche soll der Begriff "oberflächenaktive Stoffe" Stoffe, die oberflächenaktive Eigenschaften besitzen, wie Detergenzien und Alkohole, beispielsweise Glycerin, umfassen.

Vorzugsweise werden als oberflächenaktive Stoffe Polyalkohole und/oder Detergenzien, bevorzugt nichtionische Tenside, eingesetzt.

Es wurde festgestellt, daß durch diese Zusätze der gemessene Strom im Vergleich zu Biosensoren mit drei gleich immobilisierten Enzymen um ca. Faktor 40 erhöht wird.

Das zumindest zweite Enzym wird zweckmäßig durch Cross-linking, kovalente Bindung oder Matrixeinschluß immobilisiert. Vorzugsweise wird die Immobilisierung mittels Glutardialdehyd bewirkt.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird nach der Immobilisierung der Enzyme eine Deckmembran aufgebracht. Eine solche Membran, z.B. aus Nafion, PVC-Copolymer oder Celluloseacetat, erhöht vorteilhaft die Linearität der Sensoren und bewirkt zusätzlich eine Reduktion von Interferenzeinflüssen.

Ein erfindungsgemäßer Biosensor, welcher eine Arbeits-, eine Referenz- und eine Gegenelektrode aufweist und dessen Enzyme mittels des erfindungsgemäßen Verfahrens immobilisiert wurden, ist dadurch gekennzeichnet, daß die Referenzelektrode eine Ag/AgCl-Elektrode ist, die Gegenelektrode eine Kohlenstoffelektrode ist, die Arbeitselektrode aus Kohlenstoff, Metall, Metalloxiden oder einer Mischung aus Kohlenstoff und Metall oder Metalloxiden besteht und die Elektroden auf einem nicht leitenden Substrat aufgebracht sind.

Insbesondere ist ein erfindungsgemäßer Biosensor zur Bestimmung von Creatinin dadurch gekennzeichnet, daß an der Arbeitselektrode Sarkosinoxidase adsorbiert ist und darauf Creatininase und Creatinase immobilisiert sind.

In einer bevorzugten Ausgestaltung ist der Biosensor aus zwei Dreielektrodensystemen aufgebaut, welches erste Elektrodensystem mit den Enzymen Creatininase, Creatinase und Sarkosinoxidase zur Bestimmung der Summe von Creatinin und Creatin und welches zweite Elektrodensystem mit den Enzymen Creatinase und Sarkosinoxidase zur Bestimmung von Creatin dient, wobei das Ergebnis des zweiten Elektrodensystems von jenem des ersten zur Bestimmung von Creatinin abgezogen wird.

Vorteilhaft umfaßt der Biosensor ein weiteres Elektrodensystem, welches zur Eliminierung von elektrochemischen Interferenzen dient.

Die Erfindung wird nachstehend durch die folgenden Beispiele weiter veranschaulicht:

Beispiel 1

Beispiel 1 zeigt die Verbesserung der Signalhöhe durch Erhöhung der Sarkosinoxidase-Aktivität bei erfindungsgemäßem Zusatz von oberflächenaktiven Stoffen im Vergleich zum Stand der Technik.

Sarkosinoxidase wurde gelöst in Wasser (Stand der Technik) sowie in Wasser unter Zusatz von wasserlöslichen, oberflächenaktiven Komponenten (im vorliegenden Fall Glycerin sowie drei nichtionische Tenside) auf den amperometrischen Basissensor getropft und bei Raumtemperatur trocknen gelassen. Nach erfolgter Polarisation der Elektrode wurde der Strom auf 1 mM Sarkosin gemessen. Das Ergebnis der Messung ist in Tabelle 1 angeführt.

Tabelle 1

Sarkosinoxidase (SOx)	Zusatz	Strom auf 1 mM Sarkosin
54,2 mg SOx in 0,5 ml H ₂ O	keiner	2 nA
54,2 mg SOx in 0,5 ml H ₂ O	5,0 % Glycerin	80 nA
54,2 mg SOx in 0,5 ml H ₂ O	0,5 % Tween 20	70 nA
54,2 mg SOx in 0,5 ml H ₂ O	0,5 % Triton X100	90 nA
54,2 mg SOx in 0,5 ml H ₂ O	0,5 % Brij 35	85 nA

Es zeigte sich, daß der Strom auf 1 mM Sarkosin durch Detergenzien bzw. Glycerin um ca. Faktor 40 erhöht werden konnte.

Diese enorme Stromerhöhung wird offenbar dadurch bewirkt, weil das Enzym beim Trocknen durch die Zusätze optimal geschützt wird und weil die oberflächenaktiven Eigenschaften der Zusätze zu einem besseren und innigeren Verbund mit der porösen Struktur der Wasserstoffperoxidelektrode führen.

Beispiel 2

Beispiel 2 zeigt die Verbesserung der Signalhöhe sowie die Verkürzung der Ansprechzeit eines erfindungsgemäßen Biosensors im Vergleich zu einem gemäß Stand der Technik (T. Tsuchida) hergestellten Biosensor.

Es wurden zwei vollständige Creatininsensoren hergestellt, wobei beim ersten Sensor alle drei Enzyme zusammen mit Glutardialdehyd vernetzt wurden und beim zweiten Sensor Sarkosinoxidase mit Tween 20 zuerst auf die Basiselektrode aufgebracht wurde und danach Creatininase und Creatinase mit Glutardialdehyd darauf immobilisiert wurden. Die

resultierenden Ströme bzw. Ansprechzeiten zur Messung von Creatinin bzw. Sarkosin sind in Tabelle 2 angegeben.

Tabelle 2

Sarkosinoxidase	Strom auf 1 mM Creatinin	Strom auf 1 mM Sarkosin	Ansprechzeit (T90)
In Glutardialdehyd (Sensor 1)	120 nA	140 nA	80 s
In Tween 20 (Sensor 2)	420 nA	>500 nA	10 s

Es wurde mittels der erfindungsgemäßen Immobilisierung der Enzyme ein um ein Vielfaches höherer Strom gemessen. Die Ansprechzeit des erfindungsgemäß hergestellten Sensors war ebenfalls deutlich kürzer als jene des im Stand der Technik bekannten Sensors.

Beispiel 3

In Beispiel 3 ist die Herstellung eines erfindungsgemäßen Creatinin-Biosensors beschrieben.

Auf einem elektrisch nicht leitenden Substrat aus Kunststoff oder Keramik werden mittels Siebdruckverfahren Ag-Leiterbahnen für Referenz-, Gegen- und Arbeitselektroden gedruckt. Die Referenzelektrode wird zumindest im Sensorbereich aus einer Ag/AgCl-Paste hergestellt. Die Gegenelektrode wird im Meßbereich mit einer Schicht Carbonpaste bedruckt. Mit derselben Carbonpaste wird die Ag-Leiterbahn der Arbeitselektrode in den Meßbereich verlängert. Im Meßbereich der Arbeitselektrode wird eine Mischung aus 5 % Mangandioxid in Carbonpaste als Arbeitselektrode gedruckt. Im Anschluß wird das gesamte System mit Ausnahme der später mit Flüssigkeit zu kontaktierenden Elektrodenspots und der dem Signalabgriff dienenden Leiterbahnen mehrfach mit einem Isolationslack überzogen. Danach wird die Arbeitselektrode mit Sarkosinoxidase in Tween 20 - Lösung aufgetropft und trocknen gelassen. Hierauf werden die anderen Enzyme mittels Glutardialdehyd immobilisiert. Zur Erhöhung der Linearität und zur Verminderung von störenden Einflüssen wird eine Deckmembran aufgebracht.

Um Creatinin interferenzfrei bestimmen zu können, sind zumindest zwei Dreielektrodensysteme nötig; ein System mit den Enzymen Creatininase, Creatinase und Sarkosinoxidase, welches Creatinin und Creatin bestimmt, sowie ein weiteres mit den Enzymen Creatinase und Sarkosinoxidase, mit welchem Creatin bestimmt werden kann. Da

Creatin im Blut als Interferent vorkommt, muß der gemessene Creatinwert vom Meßwert der Creatinin̄elektrode abgezogen werden, der sich aus Creatin und Creatinin zusammensetzt.

Um weitere elektrochemische Interferenzen zu eliminieren, kann ein drittes Elektrodensystem mit immobilisierter Sarkosinoxidase allein (Creatin wird durch ein inaktives Protein, z.B. Albumin ersetzt) verwendet werden.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung von Biosensoren mit mindestens zwei Enzymen zur amperometrischen Bestimmung enzymatisch abbaubarer Stoffe, wie Creatinin, in biologischen Flüssigkeiten, wobei die Enzyme an einer Arbeitselektrode immobilisiert werden, dadurch gekennzeichnet, daß ein Enzym mit einem oder mehreren oberflächenaktiven Stoffen in wäßriger Lösung auf die Arbeitselektrode aufgebracht und trocknen gelassen wird und das zumindest zweite Enzym in einem nachfolgenden Schritt darauf chemisch immobilisiert wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als oberflächenaktive Stoffe Polyalkohole und/oder Detergenzien, vorzugsweise nichtionische Tenside, eingesetzt werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das zumindest zweite Enzym durch Cross-linking, kovalente Bindung oder Matriceinschluß immobilisiert wird.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß das zumindest zweite Enzym mittels Glutardialdehyd immobilisiert wird.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß nach der Immobilisierung eine Deckmembran aufgebracht wird.
6. Biosensor mit Arbeits-, Referenz- und Gegenelektrode, hergestellt mittels des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Referenzelektrode eine Ag/AgCl-Elektrode und die Gegenelektrode eine Kohlenstoffelektrode ist und die Arbeitselektrode aus Kohlenstoff, Metall, Metalloxiden oder einer Mischung aus Kohlenstoff und Metall oder Metalloxiden besteht, wobei die Elektroden auf einem nicht leitenden Substrat aufgebracht sind.
7. Biosensor nach Anspruch 6 zur Bestimmung von Creatinin, dadurch gekennzeichnet, daß an der Arbeitselektrode Sarkosinoxidase adsorbiert ist und darauf Creatininase und Creatinase immobilisiert sind.
8. Biosensor nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß er aus zwei Dreielektrodensystemen aufgebaut ist, welches erste Elektrodensystem mit den Enzymen Creatininase, Creatinase und Sarkosinoxidase zur Bestimmung der Summe von Creatinin und Creatin und welches zweite Elektrodensystem mit den Enzymen Creatinase und

Sarkosinoxidase zur Bestimmung von Creatin dient, wobei die beiden Ergebnisse zur Bestimmung von Creatinin subtrahiert werden.

9. Biosensor nach Anspruch 8, welcher ein weiteres Elektrodensystem umfaßt, das zur Eliminierung von elektrochemischen Interferenzen dient.

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K31/415 C07D233/88

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K C07D

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 466 575 A (COZZETTE STEPHEN N ET AL) 14 November 1995 (1995-11-14) cited in the application column 64, paragraph 5.5 column 32 column 74 -column 75, paragraph 6.7	7-9
A	FR 2 682 765 A (COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE ;BIOTICA INTERNATIONAL (FR); CENTRE) 23 April 1993 (1993-04-23) abstract -/-	7-9



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 August 2001

Date of mailing of the international search report

29/08/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Fritz, M

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	TSUCHIDA T ET AL: "MULTI-ENZYME MEMBRANE ELECTRODES FOR DETERMINATION OF CREATININE AND CREATINE IN SERUM" QUALITY CONTROL CLIN. CHEM. TRANSACTIONS INTERNATIONAL SYMPOSIUM, XX, XX, vol. 29, no. 1, 1983, pages 51-55, XP001008686 the whole document	7-9

FURTHER INFORMATION

PCT/ISA/210

Continuation of box I.2

Present patent claims 1-6 relate to a method for producing a biosensor that comprises at least two enzymes not specified, and to the biosensor as such, while the description provides support according to the terms of Article 5 PCT only for a specific biosensor.

In the present case, the patent claims lack the appropriate support and the patent application lacks the required disclosure to such an extent that a meaningful search encompassing the entire scope of protection sought seems impossible.

For this reason, the search was restricted to those parts of the claims that seemed to be clear, supported and disclosed according to the above mentioned terms, i.e.

a biosensor according to claims 7-9 that is produced according to the method described in claim 1.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). EPO policy, when acting as an International Preliminary Examining Authority, is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case, irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report (Article 19 PCT) or during any Chapter II procedure whereby the applicant provides new claims.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In Application No
PCT/AT 01/00138

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5466575 A	14-11-1995	US 5200051 A	06-04-1993
		US 5554339 A	10-09-1996
		US 5837446 A	17-11-1998
		US 5837454 A	17-11-1998
		CA 2002848 A	14-05-1990
		CA 2221178 A	14-05-1990
		EP 0442969 A	28-08-1991
		JP 3137612 B	26-02-2001
		JP 2000065791 A	03-03-2000
		JP 4503249 T	11-06-1992
		JP 3105919 B	06-11-2000
		US 5063081 A	05-11-1991
		US 5212050 A	18-05-1993
		WO 9005910 A	31-05-1990
		KR 175917 B	15-05-1999
		SG 45431 A	16-01-1998
FR 2682765 A	23-04-1993	NONE	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In des Aktenzeichen

PCT/AT 01/00138

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 IPK 7 A61K31/415 C07D233/88

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 A61K C07D

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 5 466 575 A (COZZETTE STEPHEN N ET AL) 14. November 1995 (1995-11-14) in der Anmeldung erwähnt Spalte 64, Absatz 5.5 Spalte 32 Spalte 74 -Spalte 75, Absatz 6.7	7-9
A	FR 2 682 765 A (COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE ;BIOTICA INTERNATIONAL (FR); CENTRE) 23. April 1993 (1993-04-23) Zusammenfassung	7-9
	-/-	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

21. August 2001

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

29/08/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Fritz, M

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	TSUCHIDA T ET AL: "MULTI-ENZYME MEMBRANE ELECTRODES FOR DETERMINATION OF CREATININE AND CREATINE IN SERUM" QUALITY CONTROL CLIN. CHEM. TRANSACTIONS INTERNATIONAL SYMPOSIUM, XX, XX, Bd. 29, Nr. 1, 1983, Seiten 51-55, XP001008686 das ganze Dokument	7-9

WEITERE ANGABEN_

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.2

Ansprüche Nr.: 1-6

Die geltenden Patentansprüche 1-6 beziehen sich auf ein Verfahren zur Herstellung eines Biosensors mit mindestens 2 nicht näher bestimmten Enzymen sowie diesen Biosensor selbst, wohingegen die Patentanmeldung Stütze durch die Beschreibung im Sinne von Art. 5 PCT nur für einen speziellen Biosensor liefert.

Im vorliegenden Fall fehlen den Patentansprüchen die entsprechende Stütze bzw. der Patentanmeldung die nötige Offenbarung in einem solchen Maße, daß eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich erscheint.

Daher wurde die Recherche auf die Teile der Patentansprüche gerichtet, welche im o.a. Sinne als klar, gestützt oder offenbart erscheinen, nämlich die Teile betreffend

einen Biosensor gemäss Ansprüche 7-9, der nach dem in Anspruch 1 beschriebenen Verfahren hergestellt wurde.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In ☐ Nationales Aktenzeichen

PCT/AT 01/00138

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5466575 A	14-11-1995	US 5200051 A	06-04-1993
		US 5554339 A	10-09-1996
		US 5837446 A	17-11-1998
		US 5837454 A	17-11-1998
		CA 2002848 A	14-05-1990
		CA 2221178 A	14-05-1990
		EP 0442969 A	28-08-1991
		JP 3137612 B	26-02-2001
		JP 2000065791 A	03-03-2000
		JP 4503249 T	11-06-1992
		JP 3105919 B	06-11-2000
		US 5063081 A	05-11-1991
		US 5212050 A	18-05-1993
		WO 9005910 A	31-05-1990
		KR 175917 B	15-05-1999
		SG 45431 A	16-01-1998
FR 2682765 A	23-04-1993	KEINE	

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts F 4991/cm	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/AT 01/00138	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 14/05/2001	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 16/05/2000
Anmelder F.HOFFMANN-LA ROCHE AG		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 5 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

- a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.

☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☒ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der **Bezeichnung der Erfindung**

☐ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☒ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

CREATININ-BIOSENSOR

5. Hinsichtlich der **Zusammenfassung**

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. _____

☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

☒ keine der Abb.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.2

Ansprüche Nr.: 1-6

Die geltenden Patentansprüche 1-6 beziehen sich auf ein Verfahren zur Herstellung eines Biosensors mit mindestens 2 nicht näher bestimmten Enzymen sowie diesen Biosensor selbst, wohingegen die Patentanmeldung Stütze durch die Beschreibung im Sinne von Art. 5 PCT nur für einen speziellen Biosensor liefert.

Im vorliegenden Fall fehlen den Patentansprüchen die entsprechende Stütze bzw. der Patentanmeldung die nötige Offenbarung in einem solchen Maße, daß eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich erscheint.

Daher wurde die Recherche auf die Teile der Patentansprüche gerichtet, welche im o.a. Sinne als klar, gestützt oder offenbart erscheinen, nämlich die Teile betreffend

einen Biosensor gemäss Ansprüche 7-9, der nach dem in Anspruch 1 beschriebenen Verfahren hergestellt wurde.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt.

A. KLASSTIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 A61K31/415 C07D233/88

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 A61K C07D

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 5 466 575 A (COZZETTE STEPHEN N ET AL) 14. November 1995 (1995-11-14) in der Anmeldung erwähnt Spalte 64, Absatz 5.5 Spalte 32 Spalte 74 -Spalte 75, Absatz 6.7 ---	7-9
A	FR 2 682 765 A (COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE ;BIOTICA INTERNATIONAL (FR); CENTRE) 23. April 1993 (1993-04-23) Zusammenfassung --- -/--	7-9



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

21. August 2001

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

29/08/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Fritz, M

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	TSUCHIDA T ET AL: "MULTI-ENZYME MEMBRANE ELECTRODES FOR DETERMINATION OF CREATININE AND CREATINE IN SERUM" QUALITY CONTROL CLIN. CHEM. TRANSACTIONS INTERNATIONAL SYMPOSIUM, XX, XX, Bd. 29, Nr. 1, 1983, Seiten 51-55, XP001008686 das ganze Dokument -----	7-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/AT 01/00138

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5466575 A	14-11-1995	US 5200051 A	06-04-1993
		US 5554339 A	10-09-1996
		US 5837446 A	17-11-1998
		US 5837454 A	17-11-1998
		CA 2002848 A	14-05-1990
		CA 2221178 A	14-05-1990
		EP 0442969 A	28-08-1991
		JP 3137612 B	26-02-2001
		JP 2000065791 A	03-03-2000
		JP 4503249 T	11-06-1992
		JP 3105919 B	06-11-2000
		US 5063081 A	05-11-1991
		US 5212050 A	18-05-1993
		WO 9005910 A	31-05-1990
		KR 175917 B	15-05-1999
		SG 45431 A	16-01-1998
FR 2682765 A	23-04-1993	NONE	